

プレニルニリン酸合成酵素の生成物特異性を決定する分子機構に関する研究

著者	野池 基義
号	3406
発行年	2004
URL	http://hdl.handle.net/10097/8678

氏名	野池 基義
学位	博士 (工学)
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の根拠法規	学位規則第 4 条第 1 項
研究科, 専攻の名称	東北大学大学院工学研究科 (博士課程) 生物工学専攻
学位論文題目	プレニルニリン酸合成酵素の生成物特異性を決定する分子機構に関する研究
指導教員	東北大学教授 西野 徳三
論文審査委員	主査 東北大学教授 西野 徳三 東北大学教授 野澤 庸則 東北大学教授 熊谷 泉

論文内容要旨

プレニルニリン酸合成酵素はアリル性ニリン酸に対するイソペンテニルニリン酸 (IPP) の連続的縮合反応を触媒する酵素群である。この反応により生成する直鎖プレニルニリン酸は、天然に多様な形で存在するイソプレノイドの前駆体となる。したがって、プレニルニリン酸合成酵素の機能解明は生体内においてイソプレノイド生産を行なう上で極めて重要である。プレニルニリン酸合成酵素群の生成物炭素鎖長は各酵素によって厳密に規定されており、その鎖長により短鎖、中鎖、長鎖型酵素に分類される。プレニルニリン酸合成酵素の分子中には、平行に並んだ複数の α -ヘリックスによりキャビティが形成されており、このキャビティ中にはアスパラギン酸に富んだ 2 つの機能モチーフが存在する。それらのモチーフのひとつ、FARM (First Aspartate-Rich Motif) は、アリル性ニリン酸結合部位として機能し、このモチーフに結合した生成物炭素鎖が、キャビティ内を α -ヘリックスに沿ってヘリックスの上流方向に伸長することが知られている。多くの短鎖型酵素においては、FARM の 4 および 5 残基上流に存在する芳香族アミノ酸が生成物の伸長をブロックすることにより、生成物炭素鎖長が制御されることが明らかになっており、その領域は CLD (chain-length determination) 領域と呼ばれている。しかしながら、短鎖型酵素の中には、FARM の上流に芳香族アミノ酸が存在しないものがあり、それらの酵素における生成物鎖長制御機構は未解明である。本学位論文は、変異型酵素を作製してその生成物鎖長を解析するという手法によって、好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus solfataricus* 由来ヘキサプレニルニリン酸 (C_{30}) 合成酵素 (HPS)、真核生物由来ゲラニルゲラニルニリン酸 (C_{20}) 合成酵素 (GGPS)、および真正細菌由来 GGPS について同機構の解明を行った研究成果についてまとめたものであり、全 6 章で構成されている。以下に各章の要約を記す。

第1章は序論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第2章では、プレニルニリン酸合成酵素の分子進化に関して述べている。*S. solfataricus* 由来 HPS は、その生成物鎖長に従えば中鎖型酵素に分類される。しかしながら、本酵素は系統学的に真核生物の短鎖型酵素に近縁であり、特に真核生物 GGPS に最も近縁であることが予想されている。したがって、本酵素はプレニルニリン酸合成酵素群の分子進化を考える上で興味深い存在である。本章では、同酵素群の生成物鎖長制御機構の分子進化過程の解明を目的とし、各生物種の短鎖型酵素の相当する部位に見られる特徴的なアミノ酸配列を *S. solfataricus* 由来 HPS の CLD 領域に導入した変異体を作製し、性質決定を行った。生成物鎖長解析の結果、真核生物のファルネシルニリン酸(C₁₅)合成酵素 (FPS) に特徴的なアミノ酸配列を導入した変異体では、野生型酵素のものよりも鎖長が減少した炭素数 20 の生成物を与え、酵素機能が短鎖型酵素へと変換された。この結果は、両酵素の近縁性を示唆するものであり、系統分類学上のデータによく一致した。また、この結果は真核生物が古細菌から派生したという、現在提唱されている仮説を間接的に支持するものであった。しかしながら、真核生物 GGPS 型の変異導入を行なった変異体では活性が認められず、系統学的に近縁であるかの知見を得ることはできなかった。真核生物 GGPS では、CLD 領域以外の部位が生成物鎖長制御を行なっている可能性があることが示唆された。

第3章では真核生物由来 GGPS の生成物鎖長制御機構に関する知見を得ることを目的とし、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 由来 GGPS の変異体を作製し、その性質決定を行った。変異導入は、当研究室で以前に行われた研究において、*Bacillus stearothermophilus* 由来ファルネシルニリン酸(C₁₅)合成酵素 (FPS) の生成物鎖長を変化させた変異部位に相当する 139 位の His に対して行い、Ala, Ser, Gly といった側鎖の小さいアミノ酸で置換した変異型 GGPS を作製した。この置換部位の近傍には、ほとんどのプレニルニリン酸合成酵素において高度に保存されている GQ というモチーフが存在しており、139 位の His は GQ モチーフの 2 残基上流に位置している。作製した変異体のうち、Ala で置換したものは炭素数 25 の生成物を与えることが分かった。また、この変異体の置換部位の 3 および 4 残基上流を Ala で置換した多重変異体は炭素数 40 以上の生成物を与えた。これらの結果から、139 位の His が生成物鎖長制御機構において重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、系統学的に *S. cerevisiae* 由来 GGPS に近縁であることが示されている、*S. solfataricus* 由来 HPS の対応する部位をより大きなアミノ酸で置換した変異型 HPS を複数作製した。これらの変異体では生成物炭素鎖長が短くなり、同部位のアミノ酸置換による分子進化経路の存在が新たに示唆された。この置換部位はプレニルニリン酸合成酵素において生成物鎖長制御に重要な役割を果たしていると考えられることから、この置換部位の周辺の領域を CLD (Chain-Length Determination) 領域 2 と命名した。

第4章では、各生物種の短鎖型酵素において CLD 領域 2 が生成物鎖長制御に果たす役割について知見を得ることを目的とし、各生物種の短鎖型酵素の CLD 領域 2 におけるアミノ酸残基を置換した変異体を作製し、その性質決定を行った。*S. cerevisiae* 由来 GGPS において、CLD 領域 2 に存在す

る GQ モチーフの 3 残基上流を Ala で置換した変異体では炭素数 25 の生成物を与えたことから、第 3 章の結果と合わせて真核生物 GGPS では GQ モチーフの 2 および 3 残基上流のアミノ酸が生成物鎖長制御を行なっていることがわかった。また、*B. stearrowthermophilus* 由来 FPS において GQ モチーフの 2 および 3 残基上流を Ala で置換した変異体では炭素数 20 の生成物を与えたことから、これらのアミノ酸は生成物鎖長制御に関与していることがわかった。同酵素では FARM の 5 残基上流の芳香族アミノ酸が生成物鎖長制御を行なっていることが以前報告されている。今回得られた結果から、真正細菌 FPS では FARM の 5 残基上流の芳香族アミノ酸と GQ モチーフの 2 および 3 残基上流のアミノ酸が協同して生成物炭素鎖の伸張をブロックすることにより生成物鎖長制御を行なっていることが示唆された。一方で、好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 由来 GGPS および真正細菌 *Erwinia uredovora* 由来 GGPS において GQ モチーフの 2 および 3 残基上流を Ala で置換した変異体では生成物鎖長に変化が見られないことから、古細菌 GGPS および真正細菌 GGPS では、置換部位のアミノ酸は生成物鎖長制御に関与しないことがわかった。以上の結果から、短鎖型酵素の CLD 領域 2 が生成物鎖長制御に与える影響は、各酵素において異なることが示唆された。

第 5 章では真正細菌由来 GGPS の生成物鎖長制御機構に関する知見を得ることを目的とし、*E. uredovora* 由来 GGPS の変異体を作製し、その性質決定を行った。変異導入にあたっては、FARM や CLD 領域 2 が存在する α -ヘリックスばかりでなく、キャビティを構成する他の α -ヘリックスも対象とし、それらに含まれる比較的高高いアミノ酸を Ala で置換した。生成物鎖長解析の結果、後者の変異導入部位のうち 121 位の Ile を置換した変異体では、野生型酵素のものよりも鎖長が増加した炭素数 30 の生成物を与えたことから、121 位の Ile は生成物鎖長制御に重要な役割を果たしており、真正細菌由来 GGPS の同制御を行なう部位は他の生物種の短鎖型酵素とは異なることが示唆された。また、真正細菌の短鎖型酵素において FARM 内に見られる挿入配列が生成物鎖長制御に与える影響について知見を得ることを目的とし、*E. uredovora* 由来 GGPS および *B. stearrowthermophilus* 由来 FPS において FARM 内の挿入配列を欠失した変異体を作製して解析を行なった。生成物分析の結果、これらの変異体の生成物鎖長に変化が見られないことから、FARM 内の挿入配列は生成物鎖長制御に関与しないことがわかった。

第 6 章は以上を総括している。

以上要するに本論文では、プレニル二リン酸合成酵素群の短鎖型酵素に分類される酵素において未解明な生成物鎖長制御機構を明らかにした。これらの酵素では、高高いアミノ酸の挿入が生成物炭素鎖の伸張をブロックするという共通の機構により生成物鎖長制御を行なっているが、同制御を行なう部位が各酵素によって異なることが示唆された。

論文審査結果の要旨

プレニルニリン酸合成酵素はアリル性ニリン酸に対するイソペンテニルニリン酸 (IPP) の連続的縮合反応を触媒する酵素群である。これらの酵素群は、その鎖長により短鎖、中鎖、長鎖型酵素に分類される。現在までに、生成物鎖長制御機構は短鎖型酵素を用いて研究が行なわれており、本酵素群において高度に保存されている 2 つのアスパラギン酸に富んだ機能モチーフのうち、最初のモチーフ (First Aspartate-Richi Motif, FARM) の周辺に見られる特徴的なアミノ酸によって同機構が行なわれていることが明かとなっている。しかし、短鎖型酵素の中には生成物鎖長制御機構が未解明なものが存在する。本学位論文は、変異型酵素を作製してその生成物鎖長を解析するという手法によって、短鎖型酵素において未解明な生成物鎖長制御機構の解明を行った研究成果についてまとめたものであり、全 6 章で構成されている。

第 1 章は序論であり、本研究の背景および目的について述べている。

第 2 章では、プレニルニリン酸合成酵素の分子進化に関して述べている。好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus solfataricus* から単離されたヘキサプレニルニリン酸合成酵素 (HPS) は生成物鎖長に従えば中鎖型酵素に分類されるが、系統学的には真核生物の短鎖型酵素に近縁であり、プレニルニリン酸合成酵素群の分子進化を考える上で興味深い存在である。本章では、同酵素群の生成物鎖長制御機構の分子進化過程の解明を目的とし、各生物種の短鎖型酵素において FARM 周辺領域に見られる特徴的なアミノ酸配列を *S. solfataricus* 由来 HPS の相当する部位に導入した変異体を作製し、性質決定を行った。生成物鎖長解析の結果、真核生物のファルネシルニリン酸合成酵素 (FPS) に特徴的なアミノ酸配列を導入した変異体では、生成物特異性が短鎖型酵素へと変換され、系統分類学上のデータによく一致した。この結果は、両酵素の近縁性を示唆するものであり、真核生物が古細菌から派生したという、現在提唱されている仮説を間接的に支持するものであった。

第 3 章では真核生物由来ゲラニルゲラニルニリン酸合成酵素 (GGPS) の生成物鎖長制御機構に関する知見を得ることを目的とし、出芽酵母由来 GGPS の変異体を作製し、その性質決定を行った。作製した変異体のうち、139 位を Ala で置換したものは生成物鎖長が増加したことから、139 位のアミノ酸が生成物鎖長制御に関与していることを明らかにした。この置換部位はプレニルニリン酸合成酵素において生成物鎖長制御に重要な役割を果たしていることが予想され、この置換部位の周辺の領域を CLD 領域 2 (Chain-Length Determination) と命名した。

第 4 章では、各生物種の短鎖型酵素において CLD 領域 2 が生成物鎖長制御に果たす役割について知見を得ることを目的とし、各酵素の CLD 領域 2 におけるアミノ酸残基をそれぞれ Ala で置換した変異体を作製し、その性質決定を行った。生成物鎖長解析の結果、この領域が生成物鎖長制御に与える影響は、各酵素において異なることを明らかにした。

第 5 章では真正細菌由来 GGPS の生成物鎖長制御機構に関する知見を得ることを目的とし、真正細菌 *Erwinia uredovora* 由来 GGPS の変異体を作製し、その性質決定を行った。作製した変異体のうち、121 位を Ala で置換したものは生成物鎖長が増加したことから、121 位のアミノ酸が生成物鎖長制御に関与していることを明らかにした。真正細菌由来 GGPS の生成物鎖長制御機構を行なう部位は、他の生物種の短鎖型酵素とは異なることが推測された。

第 6 章は以上を総括している。

以上要するに本論文では、プレニルニリン酸合成酵素群の短鎖型酵素に分類される酵素において未解明な生成物鎖長制御機構を明らかにし、酵素工学の発展に寄与することが少なくない。

よって、本論文は博士(工学)の学位論文として合格と認める。